

有机磷农药在水生态系中 生物净化机理研究

1. 对硫磷的酶解

张甬元 谭渝云 孙美娟 张进军

(中国科学院水生生物研究所)

提 要

从氧化塘系统中分离出能降解对硫磷的细菌 *Pseudomonas* sp. 代号 CTP-01, 能将对硫磷分解成对硝基酚和二乙基硫代磷酸酯, 并进一步分解对硝基酚。在有 Cu^{++} 存在的情况下, 酶比活可以达到 1×10^4 毫微克分子/毫克蛋白/分钟, Cu^{++} 对酶有激活作用, 并对温度和 pH 影响有保护作用。

对硫磷水解酶反应最适温度为 40—50℃, 超过 50℃ 活性急剧降低, 80℃ 完全失活。

CTP-01 的对硫磷水解酶大部分是同膜片结合状态存在, 超声破碎的无细胞酶制剂中, 只有 37.2% 的活力存在于可溶性蛋白部分。

水生态系中有机物质的生物净化现象从本质上说是由一系列生化反应所构成。而在水体中参与生化反应最活跃的生物即是细菌和藻类^[3]。因此, 从细胞和分子水平上研究和探讨水生态系中这些生物和污染物之间的相互作用, 是确切了解生物净化过程的重要课题, 有关农药的微生物降解已有不少报道, 起初多属确定细菌在降解过程中的作用。七十年代来又进一步发展到农药酶解的研究, 如除草剂^[2,4,5,7]、有机磷农药^[8,9]、六六六^[6]和 2,4-D^[11,12]等的酶解都曾有报道。可以认为农药在环境中的生物净化, 已从早期确定生物降解的可能性发展到研究其分子作用机理。

在鸭儿湖地区污染治理中, 采用了氧化塘作为多品种农药废水的处理措施, 取得了明显的效果, 并从生化生态方面探讨了有机磷农药在氧化塘中的净化机理。本文介绍对硫磷的酶解, 阐明对硫磷降解的基本生化反应。

材 料 和 方 法

1. 对硫磷分解菌的富集和分离

将鸭儿湖氧化塘的水样 2 升装入 2500 毫升的试剂瓶中, 加入适量的对硫磷, 在 25—30℃ 的条件下通气培养, 待溶液变黄且黄色消褪后, 再次加入对硫磷, 在富集过程中用

NaOH 调整 pH 至 7.0—7.5, 一个月后, 用修正的 Burk 无机培养基, 将上述培养物稀释 6 倍, 继续添加对硫磷通气培养。无机培养基组成如下: K_2HPO_4 0.8 克; KH_2PO_4 0.2 克; $MgSO_4$ 0.2 克; $(NH_4)_2SO_4$ 0.5 克; $CaCl_2$ 0.05 克; $NaMoO_5 \cdot 2H_2O$ 0.0033 克; $FeSO_4 \cdot 2H_2O$ 0.005 克, 用蒸馏水配至 1 升。培养 5 天后, 用无机培养基将培养物稀释 6 倍, 5 天后, 取培养液进行平板分离, 琼脂培养基的无机成份同上, 并以对硫磷为唯一碳源。从平板上将不同形状菌落接入斜面, 选出降解对硫磷较快的菌株 CTP-01, 用同样的方法以对硝基酚为唯一碳源, 选出 CTP-02 菌株, 由王德铭副教授和谢大明同志鉴定, 二者均为极毛杆菌 (*Pseudomonas* sp.)。

2. 对硫磷水解酶无细胞酶制剂的制备

取以对硫磷为唯一碳源的无机培养基中培养 3 天的 CTP-01 菌, 离心收集菌体。用 0.25 M Tris 缓冲液 (pH 7.2) 洗菌糊, 离心弃去上清液, 将细胞移入 10 毫升 0.25 M Tris 缓冲液中。在国产 CSF-250、20KC 超声波细胞破碎器中超声破碎 10 分钟, 然后在 5°C, $1.2 \times 10^4 g$ 高速离心, 去除细胞残体, 取上清液进行各种测试。作酶的存在部位试验时, 则将上述离心后的上清液再经 5°C, $1 \times 10^5 g$ 超速离心 1 小时, 分别测定上清液和沉淀中的酶活。

3. 对硫磷降解速率的测定

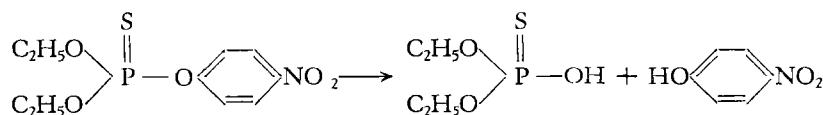
对硫磷的降解, 是从分光光度计上测定波长 410nm (nanometer) 处对硝基酚的光密度, 然后, 从对硝基酚的形成量换算成对硫磷的分解量。酶反应均在具 10 毫升刻度的试管中进行, 反应系统用 0.25 M Tris, pH 7.0, 含对硫磷 0.48 mM (millimolar), 反应时取反应系统 10 毫升, 加入适量酶制剂在 30°C 保温 10 分钟, 立即调 pH 至 8.5, 在国产 721 分光光度计上 410 nm 处读取光密度。另取反应系统 10 毫升, 不加酶, 在同样条件下保温后调 pH 至 8.5, 作测定时的对照, 以消除试剂干扰, 使光密度读数为净酶解产物。蛋白含量用 Folin-酚法测定^[1]。

酶的活性以比活表示, 即每分钟每毫克蛋白质分解对硫磷的毫微克分子数(毫微克分子数/毫克蛋白/分钟)。

结果和讨论

1. CTP-01 菌对对硫磷的降解

当以对硫磷为唯一碳源培养 CTP-01 菌时, 在培养液中生成对硝基酚, 对硝基酚生成量换算成对硫磷量与气相色谱-火焰光度测得对硫磷残留量一致。同时, 在培养过程中因对硫磷的分解伴随着 pH 下降, 由此可以证明 CTP-01 菌在降解对硫磷时, 首先在对硝基酚与二乙基硫代磷酸酯之间的 P—O 键上裂解。即:



在 2 升容器培养时, 当菌液光密度 (OD₅₀₀) 为 0.8—1.0 时, 每天每升培养液可分解 95% 对硫磷原油 11.0 克, 并将形成的对硝基酚也全部分解。

2. 对硫磷水解酶的特性

(1) 无细胞酶制剂的反应速率与底物浓度的关系

在不同底物浓度时, 对硫磷的降解速率如表 1、图 1。

表 1 底物浓度与反应速率关系

底物浓度 (S) ($\times 10^{-1} \text{mM}$)	0.024	0.072	0.120	0.168	0.480	0.960	2.40
反应速率 (V) (毫微克分子/毫克蛋白/分钟)	454.1	909.1	1364.4	1873.4	3820.1	4455.2	4911.5

表 2 不同 Cu⁺⁺ 浓度对酶活性影响

Cu ⁺⁺ 浓度 (mM)	酶比活 (毫微克分子/毫克蛋白/分钟)
0	58.4
1	948.0
2.5	1234.5*
5.0	1256.6
2.5, 热失活酶	0
2.5, 不加酶	0

* 增高 20 倍。

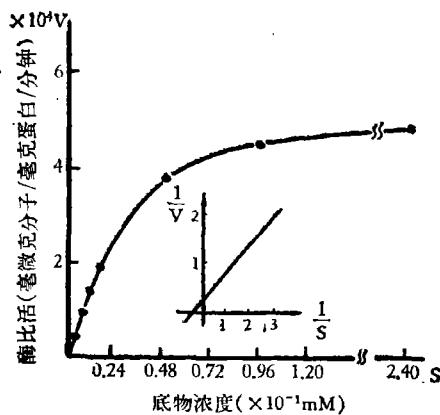


图 1 无细胞酶制剂反应速率与底物浓度的关系

从表 1 和图 1 可见酶制剂的米氏常数为 $2.3 \times 10^{-5} M$, 用双倒数作图求得最大速度为 5263 毫微克分子/毫克蛋白/分钟。

(2) 铜离子对水解酶的激活作用

观察了两价金属离子 Mn⁺⁺、Mo⁺⁺、Zn⁺⁺、Cu⁺⁺ 与对硫磷水解酶的关系后发现, Cu⁺⁺ 离子对酶的活力有明显的激活作用, 以不同 Cu⁺⁺ 浓度观察对水解酶活性的影响, 其结果如表 2。

由表 2 可见酶活力随铜离子的浓度而增高; 铜离子浓度达到 2.5mM 时, 浓度进一步提高, 对酶激活的影响不明显。铜离子除了能增进酶活性外, 尚具有对温度和 pH 变化的保护作用 (见下节)。Munnecke^[8] 曾研究了六种混合菌培养物对有机磷农药的酶解, 但未报道 Cu⁺⁺ 的作用。铜的这种作用很值得进一步探讨, 铜离子除了可能作为酶的一个辅助因子外, 尚可能是同 Cu⁺⁺ 抑制了其他杂蛋白的干扰作用有关, 或者由于铜离子与降解产物二乙基硫代磷酸酯螯合, 从而加速了降解速度。

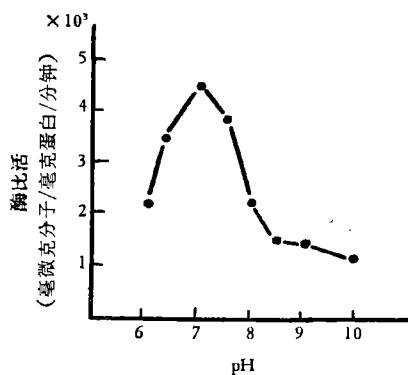


图 2 酶反应的最适 pH

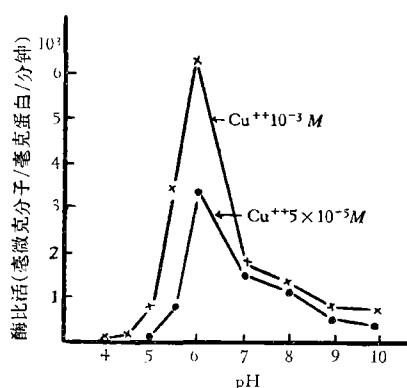


图 3 对硫磷水解酶的 pH 适应性

3. 对硫磷水解酶的最适 pH 和 pH 适应性

对硫磷水解酶的最适 pH 为 7, 见图 2。

将酶制剂在不同 pH 条件下处理 20 分钟 (室温 25°C) 后, 重新调到 pH 7, 并测定其活力, 其结果如图 3, 从试验结果可以看到在 pH 5.5 以下和 pH 8 以上对活力有明显影响, 而通过 pH 6 处理后的酶活力有显著提高。当 Cu⁺⁺ 的浓度增加到 10⁻³ M 时酶活力比 Cu⁺⁺ 浓度为 5 × 10⁻⁵ M 的约高 44%。

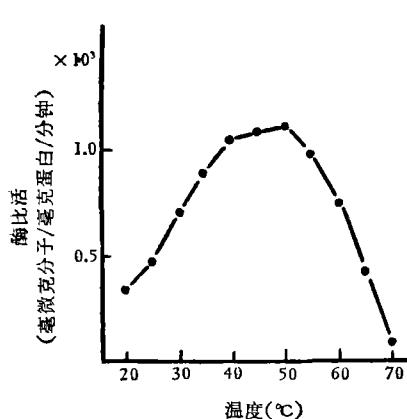
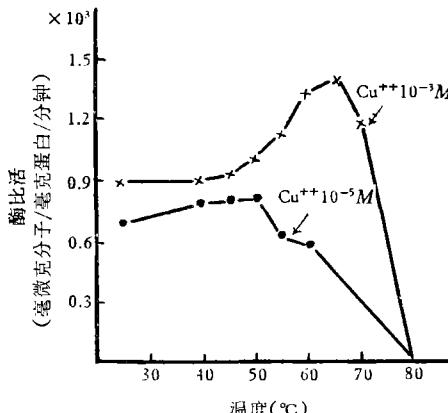


图 4 对硫磷水解酶的最适温度

图 5 酶对温度的适应性及 Cu⁺⁺ 的保护作用

进一步观察 Cu⁺⁺ 浓度分别为 5 × 10⁻⁵ M 和 10⁻³ M 时, 在不同 pH 条件下保存酶制剂 (0—5°C), 28 天内活性的变化如表 3。从表 3 可以看到, 在 pH 6 的条件下, Cu⁺⁺ 浓度为 5 × 10⁻⁵ M 时, 保存 30 小时后酶活性下降, 15 天后只剩下原来的 3.5%。当 Cu⁺⁺ 增加到 10⁻³ M 时, 6 天后活性不变, 28 天保留活性 38.9%。在 pH 7 的条件下, 在一定时间内酶的活力随保存时间的延长而逐渐增加, 第 6 天 Cu⁺⁺ 为 5 × 10⁻⁵ M, 活力增加了约 1.9 倍, Cu⁺⁺ 为 10⁻³ M 增加了约 1.5 倍。第 15 天, 铜离子浓度低者活力开始下降, 浓度高者保持不变, 第 28 天活力显著下降, 但 Cu⁺⁺ 浓度为 10⁻³ M 者尚保持最高活力的 55.7%, 可见铜离子对酶活力的保护作用是很明显的。同时从实验结果可以看到短时间

内的 pH 6 处理可以提高酶活, 但长期保存还是 pH 7 最为合适。

表 3 各种 pH 条件和 Cu⁺⁺ 浓度时酶的活力与保存时间关系 (单位: 毫微克分子/毫克蛋白/分钟)

pH	Cu ⁺⁺ 浓度 (M)	保 存 时 间					
		20 分	30 小时	3 天	6 天	15 天	28 天
4.0	5×10 ⁻⁵	28.5					
	5×10 ⁻³	183.2					
5.0	5×10 ⁻⁵	325.6	4.1				
	1×10 ⁻³	3133.8	122.1				
6.0	5×10 ⁻⁵	14481.5	9769.8	8546.8	8953.8	512.8	
	1×10 ⁻³	25640.4	22791.4	21774.0	23605.4	19128.5	9971.3
7.0	5×10 ⁻⁵	6104.9	7122.3	12616.7	17907.6	9360.7	3662.9
	1×10 ⁻³	6511.8	7122.3	10988.7	16483.1	17907.6	9971.3
8.0	5×10 ⁻⁵	4639.7	5697.9	5290.9	5697.9	651.2	
	1×10 ⁻³	4883.9	5372.3	5697.9	7529.3	2645.4	
10.0	5×10 ⁻⁵	1383.8	61.1				
	1×10 ⁻³	3133.8	508.7	419.2	476.2	468.0	

4. 酶的温度适应性及反应最适温度

对硫磷水解酶的最适温度在 40—50℃ 之间(图 4)。当酶制剂在不同温度下处理 20 分钟后, 立即恢复至 30℃, 并测定水解活力以观察酶对温度的适应性(图 5), 结果表明温度超过 50℃ 活力下降, 而在 80℃ 条件下处理酶完全失活。当增加铜离子的浓度到 1×10⁻³ M 时, 酶的活性在 65℃ 后才急速降低, 可见 Cu⁺⁺ 能增加酶的适应范围。

根据 pH 和温度适应性试验可见 CTP-01 的对硫磷水解酶是比较稳定的。

5. 对硫磷水解酶在细胞内存在的部位

加入分离提取中常用表面活性剂, 使与细胞膜和亚细胞器内膜上结合的酶释放出来。如用 Triton X-100 可使 *Noceorllia* sp. 菌释放出比较纯的胆固醇氧化酶。我们用非离子型表面活性剂 Triton X-100 与 CTP-01 菌一起超声处理, 并与不加表面活性剂的对照, 其结果如表 4。

表 4 Triton X-100 对酶提出率的影响

Triton X-100 浓度 (%)	酶制剂蛋白含量 (毫克/毫升)	酶 比 活 (毫微克分子/毫克蛋白/分钟)
0	1.5	2284.7
0.5	1.4	4109.7
1.0	1.8	3732.8

由表4可见，在加入 Triton X-100 时，使无细胞酶制剂的活力提高了0.8倍，表明 CTP-01 菌对硫磷水解酶有很大一部分系同膜片呈结合状存在。

当超声破碎细胞在 $1.2 \times 10^4 g$ 离心去除细胞残体后的上清液，再经 $1 \times 10^5 g$ 超速离心收集膜片，并分别测定上清液和沉淀的酶活，结果见表5。

表 5 $1 \times 10^5 g$ 超速离心后上清液及沉淀酶活比较

		单位活力 (OD ₄₁₀ /毫升)	酶 比 活 (毫微克分子/毫克蛋白/分钟)
$1.2 \times 10^4 g$ 离心	上清液	20,000	24,235.2
$1 \times 10^5 g$ 离心	上清液	4,700	12,722.8
	沉淀*	9,400	—

* 离心后，将沉淀用缓冲液稀释到原体积，测定活性。

从表5可见，在可溶性蛋白部分即超速离心的上清液中酶的比活是超速离心前的37.2%，而62.8%留在沉淀中，以单位活力表示测定沉淀的活性表明66.7%的活性存在于沉淀之中。

以上结果进一步证明了对硫磷水解酶在细胞中大部分是以同细胞膜片结合状而存在。Munnecke^[10]曾用分解有机磷农药的混合菌培养物做成酶制剂并用多孔玻璃为载体制备固化酶，虽然固化酶的活性较高，但结合率较低，可能与酶大部以结合状存在有关，由于对硫磷水解酶性质比较稳定，很有可能发展成为一种新型的酶学处理方法。由于CTP-01菌中对硫磷水解酶大部分为结合状态存在，因此，采用固定化细胞的方法，比固定化酶更为简便、经济。我们曾用戊二醛-明胶作为包埋剂做成固化菌，初步试验表明每克固化菌降解速度可达21.5微克分子/小时，经60天存放仍可保持活力80%。

参 考 文 献

- [1] 潘家秀等，1962. 蛋白质化学研究技术。第28—29页。科学出版社。
- [2] Blake, J. and D. D. Kaufman, 1975. Characterization of seylanilide-hydrolyzing enzyme(s) from *Fusarium oxysporum schlecht.* *Pestic. Biochem. Physiol.*, 5(4): 305—313.
- [3] Dugan, P. R., 1972. Biochemical ecology of water pollution. U. S. A.
- [4] Engelhardt, G., Wallnöfer, P. R. and R. Plapp, 1971. Degradation of linuron and some other herbicides and fungicides by a linuron-inducible enzyme obtained from *Bacillus sphaericus*. *Appl. Microbiol.*, 22(3): 284—288.
- [5] Engelhardt, G., Wallnöfer, P. R. and R. Plapp, 1973. Purification and properties of an aryl acylamidase of *Bacillus sphaericus*, catalyzing the hydrolysis of various phenylamidine herbicides and fungicides. *Appl. Microbiol.*, 26(5): 709—718.
- [6] Heritage, A. D. and J. C. MacRae, 1977. Degradation of linuron by cell-free preparations of *Clostridium sphenoides*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 34(2): 222—223.
- [7] Lanzilotta, R. P. and D. Pramer, 1970. Herbicide transformation II. Studies with an acylamidase of *Fusarium solani*. *Appl. Microbiol.*, 19(2): 307—313.
- [8] Munnecke, D. M., 1976. Enzymatic hydrolysis of organophosphate insecticides. a possible pesticide disposal method. *Appl. Environ. Microbiol.*, 32(1): 7—13.
- [9] Munnecke, D. M. and D. P. H. Hsich, 1976. Pathways of microbial metabolism of parathion. *Appl. Environ. Microbiol.*, 31(1): 63—69.

- [10] Munnecke, D. M. 1977. Properties of an immobilized pesticide hydrolyzing enzyme. *Appl. Environ. Microbiol.*, **33**(3): 503—507.
- [11] Tiedje, J. M. and M. Alexander, 1969. Enzymatic cleavage of the ether bond of 2,4-Dichlorophenoxyacetate. *J. Agric. Food Chem.*, **17**: 1080—1084.
- [12] Wallnöfer, P. R. and J. Bader, 1970. Degradation of urea herbicides by cell-free extract of *Bacillus sphaericus*. *Appl. Microbiol.*, **19**(5): 714—717.

MECHANISM OF BIODEGRADATION OF ORGANOPHOSPHATE PESTICIDES IN AQUATIC ECOSYSTEM

1. ENZYMATIC HYDROLYSIS OF PARATHION

Zhang Yongyuan Tan Yuyun Sun Meijuan and Zhang Jinjun

(*Institute of Hydrobiology, Academia Sinica*)

Abstract

Two strains of bacteria which are able to grow on parathion and p-nitrophenol as sole carbon sources were isolated from the oxidation pond in YL region. The bacteria were indentified as *Psuedomonas* sp. CTP-01 and CTP-02 respectively. Parathion was rapidly degraded by *Pseudomonas* sp. CTP-01 to produce diethyl thiophosphate and p-nitrophenol, the latter being further metabolized. The enzymatic hydrolysis of parathion was investigated. Cellfree enzyme preparation of *Psuedomonas* sp. CTP-01 hydrolyzed parathion at maximum rate of 1×10^4 n moles/mg Prot./min. The optimum temperature was 45—50°C. The activity was completely lost at 80°C. The optimum pH for the activity of cell free enzyme preparation is 7.0—7.5. Cu⁺⁺ ion caused activation of the enzyme. In the presence of $10^{-8} M$ Cu⁺⁺ the activity increased about 20 time.